CE IVD
Fabricado en Alemania

25°
18°

R 36/37/38-42,
S 22-24-26-37/39

Equipo de extracción de ADN oCheck®

Manual de instrucciones

Preparación con una columna (n.º de catálogo 515 040)
Preparación con banda de 8 columnas (n.º de catálogo 515 050)

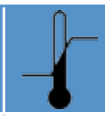
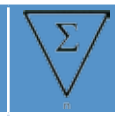
Para uso diagnóstico in vitro únicamente por parte de personal de laboratorio profesional

Revisión 00 / Febrero de 2011

Greiner Bio-One GmbH
Maybachstr. 2 • 72636 Frickenhausen • Alemania
Teléfono: +49 (0) 7022 948-0 • Fax: +49 (0) 7022 948-514
info@de.gbo.com • www.gbo.com/bioscience

greiner bio-one

GLOSARIO DE SÍMBOLOS

											
en	Do not reuse	Use by	Consult Instructions for Use	Catalog Number	Manufacturer	In Vitro Diagnostic Medical Device	Temperature limitation	Contents sufficient for <n> tests	Irritant	Batch code	Important Note
de	Nicht wiederverwenden	Mindestens haltbar bis	Vor Gebrauch Anweisung lesen	Katalognummer	Hersteller	In-vitro-Diagnostikum	Temperaturbegrenzung	Inhalt ausreichend für <n> Tests	Reizend	Chargenbezeichnung	Wichtiger Hinweis
fr	Ne pas réutiliser	Date limite de conservation jusqu'au	Lire les instructions avant utilisation	Numéro de référence	Fabricant	Produit médical de diagnostic in-vitro	Limite de température	Contenu suffisant pour <n> tests	irritant	N° de lot	Note importante
es	No utilizar más	A utilizar preferiblemente antes de	Antes de usar, lea las instrucciones	Número de catálogo	Fabricante	Producto medicinal de diagnóstica in vitro	Limitación de temperatura	Contenido suficiente para <n> ensayos	irritante	Código de lote	Nota importante
it	Non riutilizzabile	Da utilizzare entro e non oltre	Leggere le istruzioni prima dell'uso	Numero catalogo	Produttore	Dispositivo medico-diagnostico in-vitro	Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> test	Irritante	Codice del lotto	Nota importante
pt	Não utilzar mais	A utilizar preferívelmente antes de	Antes de usar, leia as instruções	Número de catálogo	Fabricante	Producto medicinal de diagnóstica in vitro	Limitação de temperatura	Conteúdo suficiente para <n> ensaios	irritante	Código do lote	Aviso importante
nl	Niet opnieuw gebruiken	Tenminste houdbaar tot	Gebruiksaanwijzing lezen	Catalogusnummer	Fabrikant	In vitro diagnostisch medisch product	Temperatuurbeperking	Voldoende inhoud voor <n> tests	Irriterend	Lot nummer	Belangrijke opmerking
da	Må ikke genbruges	Anvendes senest	Læs brugsanvisningen	Katalognummer	Producent	In vitro meskdicin doagnose-apparat	Temperaturbegrænsær	Indeholder nok til <n> test	Lokalirriterende	Lotnummer	Vigtig henvisning
sv	Får ej återanvändas	Sista förbrukningsdag	Läs bruksanvisningen före användning	Katalognummer	Tillverkare	In vitro-medicinsk doagnostisk apparatur	Temperatur-begränsning	Innehållet räcker till <n> tester	irriterande	Lot nummer	Viktigt meddelande
pl	Nie stosować ponownie	Termin zydatności	Przed użyciem przeczytać instrukcję	Numer katalogowy	Producent	Diagnostyka in vitro Produktyw	Ograniczenie temperatury	Zawartość wystarcza na <n> testów	drażniący	Kod partii	Ważne
no	Må ikke brukes flere ganger	holdbar til	Les bruksanvisning før bruk	katalognummer	produsent	in vitro-diagnostisk medisinsk utstyr	temperaturbegrensning	Innhold tilstrekkelig for <n> tester	irriterende	batch nr.	Viktig merknad
el	Προϊόν μίας χρήσης	Χρήση έως	Συμβουλευτείτε τις Οδηγίες χρήσης	Αριθμός καταλόγου	Κατασκευαστής	In Vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή	Περιορισμοί θερμοκρασίας	περιέχει επαρκές υλικό για < n > δοκιμασίες	Ερεθιστικό	Κωδικός παρτίδας	Σημαντική σημείωση
tr	Yeniden ullanmayın	Son kullanma tarihi:	Kullanmadan önce talimatı okuyun	Katalog numarası	Üretici firma	In vitro diagnostik tıbbi tanı ürünü	Sıcaklık sınırlaması	İçeriği <n> test için yeterlidir	Tahriş edici	Parti kodu	Önemli Not

ÍNDICE

1. CONTENIDO DEL EQUIPO 5
2. CONSUMIBLES Y EQUIPO NECESARIOS 6
   - 2.1 Preparación con una columna (n.º de catálogo 515 040) 6
   - 2.2 Preparación con banda de 8 columnas (n.º de catálogo 515 050) 7
3. TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO 8
4. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD 8
5. ELIMINACIÓN DE RESIDUOS 9
6. INTRODUCCIÓN 10
   - 6.1 Uso previsto 10
   - 6.2 Uso indebido 10
   - 6.3 Muestras 11
   - 6.4 Principio básico de purificación del ADN 11
7. INSTRUCCIONES PARA LA SECUENCIA DE TRABAJO DE oCheck® 12
   - 7.1 Instrucciones generales 12
   - 7.2 Separación de las salas 12
   - 7.3 Advertencias y precauciones 13
     - 7.3.1 Prevención de la contaminación 13
     - 7.3.2 Precauciones generales 13
     - 7.3.3 Seguridad en el trabajo 14
8. PREPARACIÓN CON UNA COLUMNA (n.º de catálogo 515 040) 15
   - 8.1 Preparación de soluciones de trabajo y condiciones de almacenamiento 15
   - 8.2 Preparación de muestras 16
     - 8.2.1 Preparación de muestras para Papill**oCheck**® y Papill**oCheck**® high-risk 16
     - 8.2.2 Preparación de muestras para Pelv**oCheck**® CT/NG 16
   - 8.3 Protocolo estándar 17
     - 8.3.1 Preparación 17
     - 8.3.2 Prelisis 17
     - 8.3.3 Lisis 17
     - 8.3.4 Ajuste de las condiciones de unión del ADN 17
     - 8.3.5 Unión del ADN 18
     - 8.3.6 Lavado de las columnas de centrifugado 18
     - 8.3.7 Secado de las columnas de centrifugado 18
     - 8.3.8 Elución del ADN 19

9. GUÍA DE INSTALACIÓN Y TRABAJO PARA oCheck® VACSET Y oCheck® VACPUMP 20
9.1 Contenido 20
9.1.1 oCheck® VacSet 20
9.1.2 oCheck® VacPump 21
9.2 Montaje de oCheck® VacSet 22
9.2.1 Preparación para el lavado y la unión del ADN 22
9.2.2 Preparación para la elución del ADN 23
9.3 Montaje de oCheck® VacPump 24
9.4 Preparación del sistema de vacío 24
9.5 Aplicación del vacío 24
9.6 Ventilación del sistema de vacío 24
10. PREPARACIÓN CON BANDA DE 8 COLUMNAS (n.º de catálogo 515 050) 25
10.1 Preparación de soluciones de trabajo y condiciones de almacenamiento 25
10.2 Preparación de muestras 26
10.2.1 Preparación de muestras para Papill**oCheck**® y Papill**oCheck**® high-risk 26
10.3 Protocolo estándar 27
10.3.1 Preparación 27
10.3.2 Prelisis 27
10.3.3 Lisis 27
10.3.4 Ajuste de las condiciones de unión del ADN 27
10.3.5 Unión del ADN 28
10.3.6 Lavado de bandas de columnas 30
10.3.7 Secado de bandas de columnas 31
10.3.8 Elución del ADN 31
11. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS 33
12. ASISTENCIA TÉCNICA 34
13. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO 34
14. PROTOCOLOS BREVES 35
14.1 Protocolo breve para preparación con una columna (n.º de catálogo 515 040) 35
14.2 Protocolo breve para preparación con banda de 8 columnas (n.º de catálogo 515 050) 37

1. CONTENIDO DEL EQUIPO

Equipo de extracción de ADN oCheck®	Nombre	Preparación con una columna (n.º de catálogo 515 040)	Preparación con banda de 8 columnas (n.º de catálogo 515 050)
BUF L1	Tampón L1	20 ml	20 ml
BUF L2	Tampón L2	12 ml	24 ml
REAG L3	Reactivo L3	3 ml	6 ml
BUF W1	Tampón W1	30 ml	75 ml
BUF W2	Tampón W2 (concentrado)	14 ml	50 ml
BUF E	Tampón E	15 ml	50 ml
Proteinase K	Proteinasa K (liofilizada)	30 mg	75 mg
Proteinase BUF PKB	Tampón de proteinasa PKB	1,8 ml	3,6 ml
Carrier RNA	ARN portador (liofilizado)	0,3 mg	0,3 mg
Spin Columns	Columnas de centrifugado	50	-
Collection Tubes	Tubos de colección	250	-
Binding Strips	Banda de columnas	-	12
Paper Sheet	Hoja de papel	-	10
BUF L4	Etiqueta para tampón L4	1	1
	Descargar instrucciones para el manual	1	1

2. CONSUMIBLES Y EQUIPO NECESARIOS

2.1 Preparación con una columna (n.º de catálogo 515 040)

Consumibles	N.º de catálogo de Greiner Bio-One	Cantidad (unidades)
Equipo de extracción de ADN oCheck® – Preparación con una columna	515 040	50 prep.
Puntas de filtro de micropipeta libres de desoxirribonucleasa estériles		
	765 288	96
Puntas de filtro de 0,5-10 µl	774 288	96
Puntas de filtro de 0,5-20 µl	772 288	96
Puntas de filtro de 10-100 µl	739 288	96
Puntas de filtro de 10-200 µl	750 288	60
Puntas de filtro de 100-1000 µl		
Otros consumibles necesarios		
• Microtubos de 1,5 ó 2 ml con tapa de seguridad o tapa roscada para los pasos de lisis • Etanol p.a. ≥ 99,8% • Guantes de un solo uso		
Otro equipo necesario		
• Microcentrífuga adecuada para microtubos de 1,5 ó 2 ml y 11.000 g • Vortex • Bloque de calentamiento, baño María o Thermomixer adecuado para microtubos de 1,5 ó 2 ml para incubación a 70 y 56 °C • Micropipetas de entre 1 y 1000 µl • Contenedor de desechos • Reloj de control		

2.2 Preparación con banda de 8 columnas (n.º de catálogo 515 050)

Consumibles	N.º de catálogo de Greiner Bio-One	Cantidad (unidades)
Equipo de extracción de ADN oCheck® – Preparación con banda de 8 columnas	515 050	12 x 8 prep.
Puntas de filtro de micropipeta libres de desoxirribonucleasa estériles		
Puntas de filtro de 0,5-10 µl	765 288	96
Puntas de filtro de 0,5-20 µl	774 288	96
Puntas de filtro de 10-100 µl	772 288	96
Puntas de filtro de 10-200 µl	739 288	96
Puntas de filtro de 100-1000 µl	750 288	60
Tiras de tubo con 8 tubos PCR sin tapa	673 210	125
Tiras de tapa para tiras de tubo con 8 tubos	373 270	125
Tubos PCR singulares	671 201	500

Equipo	N.º de catálogo de Greiner Bio-One	Cantidad (unidades)
oCheck® VacSet, conjunto de vacío	863 080	1
oCheck® VacPump, bomba de vacío	863 070	1

Otros consumibles necesarios

- Microtubos de 1,5 ó 2 ml con tapa de seguridad o tapa roscada para los pasos de lisis
- Depósito de tampón desechable, volúmenes: 25 y 100 ml
- Puntas de micropipeta (para volumen de 1200 µl) para multipipeta de 8 canales
- Etanol p.a. ≥ 99,8%
- Guantes de un solo uso

Otro equipo necesario

- Microcentrífuga adecuada para microtubos de 1,5 ó 2 ml y 11.000 g
- Vortex
- Bloque de calentamiento, baño María o Thermomixer adecuado para microtubos de 1,5 ó 2 ml para incubación a 70 y 56 °C
- Micropipetas de entre 1 y 1000 µl
- Multipipeta de 8 canales para grandes volúmenes (entre 50 y 1200 µl)
- Contenedor de desechos
- Reloj de control
- Gradilla PCR

3. TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO

El transporte y el almacenamiento del Equipo de extracción de ADN oCheck® se realizan a temperatura ambiente. Para más información sobre el almacenamiento de soluciones de trabajo preparadas, consulte las secciones 8.1 y 10.1.

4. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

Los siguientes componentes del Equipo de extracción de ADN oCheck® contienen elementos peligrosos.

Utilice guantes y gafas de seguridad y siga las instrucciones de seguridad proporcionadas en esta sección.

Componente	Contenido peligroso	Símbolo de peligro	Frases de riesgo	Frases de riesgo	Frases de seguridad
Tampón L2	Clorhidrato de guanidina	*	Nocivo en caso de ingestión. Irrita los ojos y la piel	R 22-36/38	
Tampón W1	Clorhidrato de guanidina + isopropanol < 25%	*	Inflamable. Nocivo en caso de ingestión. Irrita los ojos y la piel	R 10-22-36/38	S7-16-25
Proteinasa K	Proteinasa K, liofilizada	*	Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel. Posibilidad de sensibilización por inhalación	R 36/37/38-42	S 22-24-26-36/37

* La etiqueta de peligro no es necesaria si la cantidad por frasco es inferior a 125 g o ml (según 67/548/CEE Art. 25, 1999/45/CE Art. 12 y las normas alemanas GefStoffV § 20 (3) y TRGS 200 7.1). Para más información, consulte las fichas de datos de seguridad.

Frases de riesgo

R10	Inflamable
R22	Nocivo en caso de ingestión
R 36/37/38	Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel
R 36/38	Irrita los ojos y la piel
R 42	Posibilidad de sensibilización por inhalación

Frases de seguridad

S7	Manténgase el recipiente bien cerrado.
S16	Conservar alejado de fuentes de ignición. No fumar
S 22	No respirar el polvo
S 24	Evítese el contacto con la piel
S 25	Evítese el contacto con los ojos
S 26	En caso de contacto con los ojos, lávese inmediatamente con agua abundante y acuda a un médico
S 36/37	Utilizar indumentaria y guantes de protección adecuados

La versión actual de las fichas de datos de seguridad de este producto se puede descargar del sitio web de Greiner Bio-One: **www.gbo.com/bioscience/biochips_download**

5. ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

El clorhidrato de guanidina en los tampones L2 y W1 puede formar compuestos muy reactivos cuando se mezcla con lejía. No se debe añadir lejía ni soluciones ácidas directamente a los residuos de preparación de las muestras.

La contaminación de los residuos líquidos con material infeccioso de desecho es muy improbable aunque no puede quedar totalmente excluida. Por lo tanto, los residuos líquidos se deben considerar como infecciosos y, por tanto, manipularse y eliminarse de acuerdo con las normativas de seguridad locales. Respete las normativas locales, provinciales y nacionales relativas a la eliminación de residuos.

6. INTRODUCCIÓN

6.1 Uso previsto

El Equipo de extracción de ADN oCheck® (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 515 040 o n.º de catálogo 515 050) es un equipo de diagnóstico in vitro diseñado para la preparación de ADN procedente de muestras de origen humano para su posterior análisis con ensayos de la gama de productos oCheck® .

El método utilizado para el aislamiento de ácido nucleico en las diversas versiones del Equipo de extracción de ADN oCheck® genera ADN adecuado para su posterior análisis directo con los siguientes equipos:

Equipo de extracción de ADN oCheck® - Preparación con una columna (n.º de catálogo 515 040)
- Papill**oCheck**® (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 465 060)
- Papill**oCheck**® high-risk (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 505 060)
- Pelv**oCheck**® CT/NG (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 504 002)

Equipo de extracción de ADN oCheck® - Preparación con banda de 8 columnas (n.º de catálogo 515 050)
- Papill**oCheck**® (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 465 060)
- Papill**oCheck**® high-risk (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 505 060)

No se recomienda el uso del Equipo de extracción de ADN oCheck® - Preparación con banda de 8 columnas para aislar el ADN para su análisis posterior con el ensayo Pelv**oCheck**® CT/NG (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 504 002) hasta que no haya finalizado la validación.

El Equipo de extracción de ADN oCheck® está previsto para ser utilizado exclusivamente con ensayos de la gama de productos oCheck® (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) que especifiquen el uso del Equipo de extracción de ADN oCheck® en sus manuales de instrucciones.

El Equipo de extracción de ADN oCheck® cumple los requisitos de la directiva sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro (98/78/CE) y por tanto presenta la marca de conformidad CE.
El producto está previsto para ser utilizado ÚNICAMENTE por profesionales, como técnicos y personal médico, formados en técnicas de biología molecular.

6.2 Uso indebido

El Equipo de extracción de ADN oCheck® **NO** está previsto para su uso con Carn**oCheck**® (Greiner Bio-One), Par**oCheck**® (Greiner-Bio-One) ni ningún otro producto que no forme parte de la gama de productos oCheck® .

6.3 Muestras

Para la aplicación posterior de Papill**oCheck**® (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 465 060) y Papill**oCheck**® high-risk (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 505 060), se ha diseñado y probado el Equipo de extracción de ADN oCheck® para la extracción de **ADN viral y genómico humano** de **citologías cervicouterinas humanas** obtenidas con uno de los sistemas de recogida de muestras siguientes:

- Papill**oCheck**® Collection Kit (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 465 070)
- PreservCyt® (Hologic, Bedford, MA, EE. UU.)
- Surepath™ (BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.)
- STM™ (Qiagen, Hilden, Alemania)

Para la aplicación posterior del ensayo Pelv**oCheck**® CT/NG (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 504 002), se ha validado el Equipo de extracción de ADN oCheck® para la extracción de **ADN bacteriano y genómico humano** de **muestras de orina humana** obtenidas mediante los siguientes sistemas de toma de muestras:

- Pelv**oCheck**® Collection Kit SAFE (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 453 100)
- Pelv**oCheck**® Collection Kit STRAW (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 453 101)

El resto de los sistemas de toma de muestras no están validados y no se deben utilizar con el Equipo de extracción de ADN oCheck® .

6.4 Principio básico de purificación del ADN

El Equipo de extracción de ADN oCheck® se ha diseñado para realizar la purificación de ADN viral, bacteriano y genómico humano a partir de muestras de origen humano. Las muestras se lisan de manera rápida y eficiente añadiendo proteinasa K y tampón L1. El tampón de lisis y el etanol crean las condiciones adecuadas para la unión de los ácidos nucleicos a la membrana de sílice de las columnas. El ARN portador mejora la unión y la recuperación de ADN viral, bacteriano y genómico en bajas concentraciones. Los contaminantes (inhibidores potenciales de PCR) como las sales, los metabolitos y los componentes celulares macromoleculares solubles se eliminan durante el lavado con tampones etanólicos. Finalmente, se eluye el ADN viral, bacteriano y genómico humano puro a baja fuerza iónica en un tampón de elución ligeramente alcalino. Una vez purificado el ADN, se obtiene una solución adecuada para el análisis directo con los ensayos de la gama de productos oCheck® .

7. INSTRUCCIONES PARA LA SECUENCIA DE TRABAJO DE oCheck®

7.1 Instrucciones generales

Las siguientes instrucciones se basan en la experiencia de laboratorio con la implantación de las técnicas de vanguardia actualmente utilizadas en biología molecular y pretenden garantizar la máxima seguridad para los métodos basados en PCR. Se deben tomar las precauciones que se estimen razonables cuando se usa el Equipo de extracción de ADN oCheck® junto con el análisis posterior del ADN purificado con ensayos de la gama de productos oCheck® .

En general, los procesos de biología molecular tales como la detección, amplificación y extracción de ADN deben ser realizados por personal con la formación adecuada. Además, es preciso contar con una secuencia de trabajo clara y bien estructurada que impida la obtención de resultados erróneos como consecuencia de la degradación o contaminación de los productos de amplificación del ácido nucleico en las muestras. Para garantizar dicha secuencia es necesario separar las zonas dedicadas a la extracción y a la amplificación.

No introduzca nunca un producto de amplificación en una zona destinada exclusivamente a la extracción. Ambas zonas deben estar provistas de equipos, consumibles, batas de laboratorio y guantes diferentes. No transfiera nunca batas, guantes ni equipo de la zona dedicada a la extracción a la zona dedicada a la amplificación.

7.2 Separación de las salas

La figura 1 muestra un ejemplo de cómo se puede dividir un laboratorio en tres secciones diferentes. Una sección se utiliza para la extracción de ADN, otra se dedica a la preparación y generación de las reacciones PCR y la última se dedica a la hibridación y al análisis. Cada sala se debe utilizar exclusivamente para la aplicación o técnica indicada a fin de impedir la contaminación de las muestras. El uso de diferentes colores puede ayudar a evitar un intercambio accidental de equipo y consumibles entre las zonas.

! No se deben intercambiar equipos ni consumibles entre las diferentes salas o espacios del laboratorio. Por tanto, es obligatoria la duplicación de equipos y consumibles.

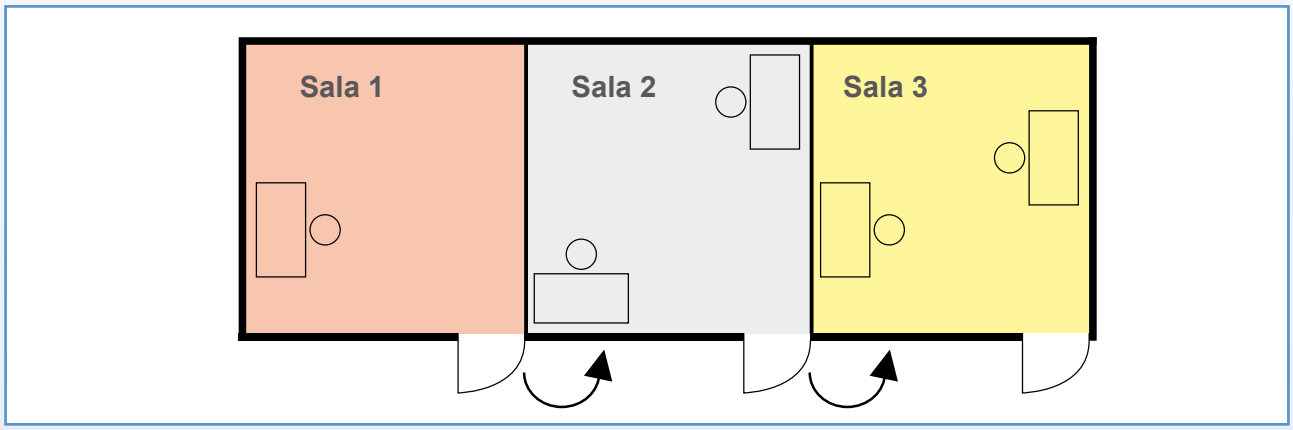


Figura 1: Separación de salas en la secuencia de trabajo de oCheck®
Sala 1: Extracción de ADN, Sala 2: Preparación de la reacción PCR y división de la mezcla de reacción en una superficie limpia; espacio separado para la adición de ADN plantilla; Sala 3: Hibridación y análisis

El procedimiento completo de extracción del ADN con el Equipo de extracción de ADN oCheck® debe realizarse en la sala 1, dedicada a la extracción de ADN. Al salir de esta sala es necesario cambiarse de bata. En la secuencia de trabajo de oCheck® la extracción de ADN es el proceso más susceptible de contaminación y, por tanto, resulta esencial cumplir estrictamente las instrucciones que figuran en este documento. Asimismo, para evitar la contaminación se deben seguir las directrices descritas en la sección 7.3.1.

En la sala 2 la mezcla de reacción para PCR se prepara y divide en una superficie limpia. La adición del ADN extraído en la sala 1 debe realizarse en otro espacio de la sala 2. Después de salir de esta habitación es necesario cambiarse la bata.

En la tercera sala del laboratorio se llevan a cabo los pasos de lavado y de reacción de hibridación. En la sala 3 se instala también el CheckScanner™ junto con el software CheckReport™ para realizar el análisis final de los ensayos de la gama de productos oCheck® .

7.3 Advertencias y precauciones

7.3.1 Prevención de la contaminación

- **Deben usarse batas de laboratorio** durante todos los procedimientos, utilizando una bata diferente para cada sala del laboratorio.
- **Se deben utilizar guantes** para cada paso del análisis y estos se deben cambiar en cada nuevo paso.
- **Limpieza del laboratorio:** el lugar de trabajo se debe descontaminar con un limpiador adecuado antes y después de trabajar.
- **Microtubos:** no toque nunca la parte interior de la tapa del microtubo. Para evitar la contaminación cruzada, abra solamente un tubo cada vez. Para evitar la contaminación use microtubos con tapa de seguridad o tapa roscada para los pasos de lisis.
- Se deben utilizar **puntas de filtro de micropipeta** adecuadas (estériles, libres de desoxirribonucleasa, ribonucleasa y ADN humano). Es preciso cambiar siempre las puntas de pipeta tras una transferencia de líquido.

7.3.2 Precauciones generales

- Cuando reciba el Equipo de extracción de ADN oCheck® compruebe que los componentes no estén dañados. Si uno de los componentes estuviera dañado (por ejemplo, frascos de tampón), póngase en contacto con su distribuidor local de Greiner Bio-One. No utilice los componentes dañados del equipo ya que podría obtener unos resultados deficientes.
- No utilice reactivos caducados.
- No utilice el Equipo de extracción de ADN oCheck® una vez superada la fecha de caducidad.
- No mezcle reactivos procedentes de lotes diferentes.
- Use únicamente los reactivos y el equipo proporcionados con el equipo de extracción y aquellos recomendados por el fabricante.
- Es necesario realizar comprobaciones y calibraciones regulares de las micropipetas, del baño María y del bloque de calentamiento.
- El pipeteado de pequeñas cantidades de líquido en el intervalo de microlitros resulta dificultoso. Por lo tanto, realice el pipeteado con las micropipetas con la mayor precisión posible.
- Todos los pasos que conlleven centrifugado deberían realizarse a **temperatura ambiente (18-25 °C).**
- Los reactivos no utilizados y los residuos deben eliminarse de acuerdo con las correspondientes directrices regionales y nacionales.

7.3.3 Seguridad en el trabajo

- Este equipo está destinado únicamente al diagnóstico in vitro y debe ser utilizado exclusivamente por personal formado en las prácticas de laboratorio para el diagnóstico in vitro.
- No pipetee nunca las soluciones utilizando la boca.
- No coma, beba, fume ni aplique productos cosméticos en las zonas de trabajo.
- Extreme la precaución al manipular las muestras biológicas que contengan material de origen humano potencialmente infeccioso. Para minimizar el riesgo de infección con material potencialmente infeccioso se recomienda trabajar en una cabina de flujo laminar hasta que se lisen las muestras. Manipule y elimine todas las muestras biológicas como si pudieran transmitir agentes infecciosos. Evite el contacto directo con las muestras biológicas y evite salpicar o pulverizar.
- Lávese las manos de forma exhaustiva después de manipular muestras y reactivos.
- Lleve siempre una bata de laboratorio, guantes y gafas de seguridad cuando trabaje con muestras humanas. La versión actual de las fichas de datos de seguridad para este producto se puede descargar del sitio web de Greiner Bio-One: **www.gbo.com/bioscience/biochips_download**

8. PREPARACIÓN CON UNA COLUMNA (n.º de catálogo 515 040)

8.1 Preparación de soluciones de trabajo y condiciones de almacenamiento

Todos los componentes del equipo se deben almacenar a **temperatura ambiente (18-25 °C)** y permanecerán estables durante **dos años** a partir de la fecha de su fabricación.

Antes de comenzar con el protocolo del Equipo de extracción de ADN oCheck® prepare las siguientes soluciones:

1. **Solución de proteinasa K:** antes de utilizar el equipo por primera vez, añada **1,35 ml de tampón de proteinasa (PKB)** para disolver la proteinasa K **liofilizada.** Divida la solución en alícuotas y almacénela a -20 °C durante como máximo 6 meses. No vuelva a congelarla.

2. **Tampón W2:** Añada **56 ml** de **etanol** (p.a. ≥ 99,8%) al concentrado de **tampón W2**. Marque la fecha actual en la etiqueta del frasco. **El tampón W2** permanece estable a **temperatura ambiente (18-25 °C)** durante como máximo un año.

3. **Tampón L4:** transfiera el **tampón L2** al **reactivo L3** en su totalidad y mezcle bien. Adhiera al frasco la etiqueta **L4** proporcionada con el equipo. Marque la fecha actual en la etiqueta del frasco. El **tampón L4** resultante permanece estable durante como máximo un año a **temperatura ambiente (18-25 °C)**.

4. Solución de **ARN portador**: añada **900 µl de tampón L1** para disolver el **ARN portador** liofilizado. Dispense el **ARN portador** disuelto en alícuotas, por ejemplo alícuotas de **35 µl**, para realizar 12 extracciones. Almacene la **solución de ARN portador disuelto** a **-20 ºC**. No vuelva a congelarlo. Las ampollas usadas se deben desechar una vez descongeladas.

Durante el almacenamiento, especialmente a temperaturas bajas, es posible que se formen precipitados blancos en **los tampones L1, L2 o L4**. Dichos precipitados se pueden disolver con facilidad si se incuba el frasco a **50-70 °C** antes de utilizarlo.

8.2 Preparación de muestras

8.2.1 Preparación de muestras para Papill**oCheck**® y Papill**oCheck**® high-risk

Las muestras de citologías cervicouterinas humanas que se tomen con
- Papill**oCheck**® Collection Kit (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 465 070)
- Medio de toma de muestras **PreservCyt**® (Hologic, Bedford, MA, EE. UU.)

se pueden procesar directamente.

Las muestras de citologías cervicouterinas humanas que se tomen con
- Medio de toma de muestras **Surepath™** (BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) se deben lavar antes de usarlas: centrifugue **250 µl** de la muestra durante **5 minutos** a **11.000 g** y resuspenda el pellet en **250 µl** de agua destilada.

Las muestras de citologías cervicouterinas humanas que se tomen con
- Medio de toma de muestras **STM™** (Qiagen, Hilden, Alemania) deben diluirse en agua destilada: **100 µl** de muestra + **150 µl** de agua destilada

!

En general, si la muestra de la citología cervicouterina está muy concentrada y ya agregada, es necesario diluir y homogeneizar la muestra antes de comenzar el proceso de extracción.

Las muestras de citologías cervicouterinas que estén muy diluidas y no presenten células visibles deben concentrarse a fin de obtener un mayor volumen de células para la extracción. Centrifugue hasta **1000 µl** de la muestra durante **5 minutos** a **11.000 g** y resuspenda el pellet en **250 µl** de agua destilada.

Este paso de concentración solo se puede aplicar a las muestras de citologías cervicouterinas tomadas mediante Papill**oCheck**® Collection Kit, el medio de toma de muestras **PreservCyt**® o el medio de toma de muestras **Surepath™**. Si se usó el medio de toma de muestras **STM™** , no es posible concentrar mediante centrifugado.

➠ Pipetee **250 µl** de la solución de la muestra en un microtubo de 1,5 ó 2 ml. Para evitar la contaminación, use microtubos con tapa de seguridad o tapa roscada para los pasos de lisis. Se recomienda validar el procedimiento completo de aislamiento del ADN en cada ciclo de extracción de ADN utilizando un **control de muestra negativo**.

8.2.2 Preparación de muestras para Pelv**oCheck**® CT/NG

Las muestras de orina humana que se tomen con:
- Pelv**oCheck**® Collection Kit SAFE (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 453 100)
- Pelv**oCheck**® Collection Kit STRAW (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 453 101)

se pueden procesar directamente.

➠ Pipetee **250 µl** de la muestra de orina en un microtubo de 1,5 ó 2 ml. Se recomienda utilizar microtubos con tapa de seguridad o tapa roscada para los pasos de lisis. Para validar la extracción de ADN se debería utilizar un **control de muestra negativo** en cada ciclo de extracción.

8.3 Protocolo estándar

8.3.1 Preparación

- Compruebe que la centrífuga esté ajustada a **temperatura ambiente (18-25 °C)**.
- Prepare las muestras según las instrucciones del capítulo 8.2.
- Caliente los bloques de calentamiento o los baños María a **56 ºC** y a **70 ºC**, respectivamente.
- Antes de la elución, incube el **tampón E** de elución a **70 ºC**.
- Asegúrese de que las soluciones de trabajo se hayan preparado según las instrucciones del capítulo 8.1.

8.3.2 Prelisis

- Añada **80 µl** de **tampón L1**.
- Añada **2,4 µl** de la solución de **ARN portador** preparada.
- Añada **20 µl** de la solución de **proteinasa K** .
- Cierre la tapa y mezcle brevemente con un Vortex de impulso.
- Incube a **56 ºC** durante al menos **30 minutos**. Agite las muestras en una Thermomixer a **650 rpm**. Si usa un bloque de calentamiento o un baño María, mezcle las muestras con Vortex de vez en cuando durante el periodo de incubación.

! Si está procesando varias muestras, **la proteinasa K, el tampón L1 y el ARN portador** se deberían premezclar inmediatamente antes del uso. No mantenga mezclados nunca el **tampón L1** y **la proteinasa K** durante más de **10–15 minutos** antes de añadirlos a la muestra. **La proteinasa K** tiene tendencia a la autolisis en **el tampón L1** en ausencia de un sustrato.

8.3.3 Lisis

- Centrifugue brevemente el microtubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.
- Añada **250 µl** de **tampón L4**.
- Cierre la tapa y mezcle brevemente con un Vortex de impulso durante **10 segundos**.
- Incube a **70 ºC** durante **15 minutos**.

! Cierre bien la tapa de los microtubos para evitar una apertura accidental.

8.3.4 Ajuste de las condiciones de unión del ADN

- Centrifugue brevemente el microtubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.
- Añada **300 µl** de **etanol** (p.a. ≥ 99,8 %) a la muestra.
- Cierrre la tapa inmediatamente y mezcle brevemente con un Vortex de impulso durante **15 segundos**.
- Centrifugue brevemente el microtubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.

8.3.5 Unión del ADN

Para evitar la contaminación: cambie los guantes antes de iniciar este paso.

- Para cada muestra coloque una **columna** en un **tubo de colección**.
- Pipetee con cuidado **450 µl** de los **lisados** en la **columna** y centrifugue a **11.000 g** durante **1 minuto** a **temperatura ambiente**. No deseche el resto del lisado.
- Deseche el **tubo de colección** con el flujo.

Para evitar la contaminación: cambie los guantes antes de iniciar este paso.

- Prepare nuevos **tubos de colección** y coloque las **columnas** en nuevos **tubos de colección**.
- Pipetee el resto de los **450 µl de lisado** en la **columna**.
- Centrifugue a **11.000 g** durante **1 minuto** a **temperatura ambiente**.

Para evitar la contaminación: cambie los guantes antes de iniciar este paso.

- Deseche el **tubo de colección** con el flujo y coloque las **columnas** en nuevos **tubos de colección**.

8.3.6 Lavado de las columnas

- Aplique **500 µl** de **tampón W1** en la **columna**.
- Centrifugue a **11.000 g** durante **1 minuto** a **temperatura ambiente**.
- Deseche el **tubo de colección** con el flujo y coloque la **columna** en un nuevo **tubo de colección**.
- Aplique **600 µl** de **tampón W2** en la **columna**.
- Centrifugue a **11.000 g** durante **1 minuto** a **temperatura ambiente**.
- Deseche el **tubo de colección** con el flujo y coloque la **columna** en un nuevo **tubo de colección**.

8.3.7 Secado de las columnas

- Centrifugue a **11.000 g** durante **1 minuto** para secar la membrana totalmente.

Este paso es necesario para eliminar los rastros de etanol. El etanol presente en el **tampón W2** inhibe las reacciones enzimáticas y debe ser completamente eliminado antes de la elución del ADN.

8.3.8 Elución del ADN

Use el **tampón E precalentado (70 °C)**.

> **!** Para evitar una pérdida de temperatura durante los pasos de pipeteado se recomienda llenar los microtubos de 1,5 ó 2 ml con un máximo de **1.300 µl de tampón E** (suficiente para n = 12 muestras).

Para evitar la contaminación: cambie los guantes antes de iniciar este paso.

- Coloque la **columna** en un microtubo de 1,5 ml limpio.
- Aplique **100 µl** de **tampón E** precalentado **(70 °C)** en el centro de la membrana de la **columna**.
- Cierre la tapa e incube a temperatura ambiente durante **1 minuto**.
- Centrifugue a **11.000 g** durante **1 minuto**.

> **!** Para obtener resultados óptimos con el ADN aislado en las aplicaciones posteriores se recomienda realizar la elución con el **tampón E** suministrado. Conserve el ADN extraído a **-20 ºC**.
> Para realizar más análisis con los ensayos de la gama de productos oCheck® consulte los manuales de instrucciones correspondientes (Papill**oCheck**®, Papill**oCheck**® high-risk y Pelv**oCheck**® CT/NG).

9. GUÍA DE INSTALACIÓN Y TRABAJO PARA oCheck® VACSET Y oCheck® VACPUMP

El sistema de vacío oCheck® se ha diseñado para realizar la purificación manual rápida en paralelo de ácidos nucleicos con el Equipo de extracción de ADN oCheck® - Preparación con banda de 8 columnas. Este sistema permite realizar rápidamente la purificación simultánea de ácidos nucleicos de gran calidad. Gracias al uso del vacío se eliminan los prolongados pasos de centrifugado y decantación. Los Equipos de extracción de ADN oCheck® están basados en la tecnología de ultrafiltrado y ofrecen una forma rápida y cómoda de purificar ácidos nucleicos.

Cuando use el Equipo de extracción de ADN oCheck® - Preparación con banda de 8 columnas con vacío, se recomienda utilizar oCheck® VacSet (n.º de catálogo 863 080) y oCheck® VacPump (n.º de catálogo 863 070) .

9.1 Contenido

9.1.1 oCheck® VacSet

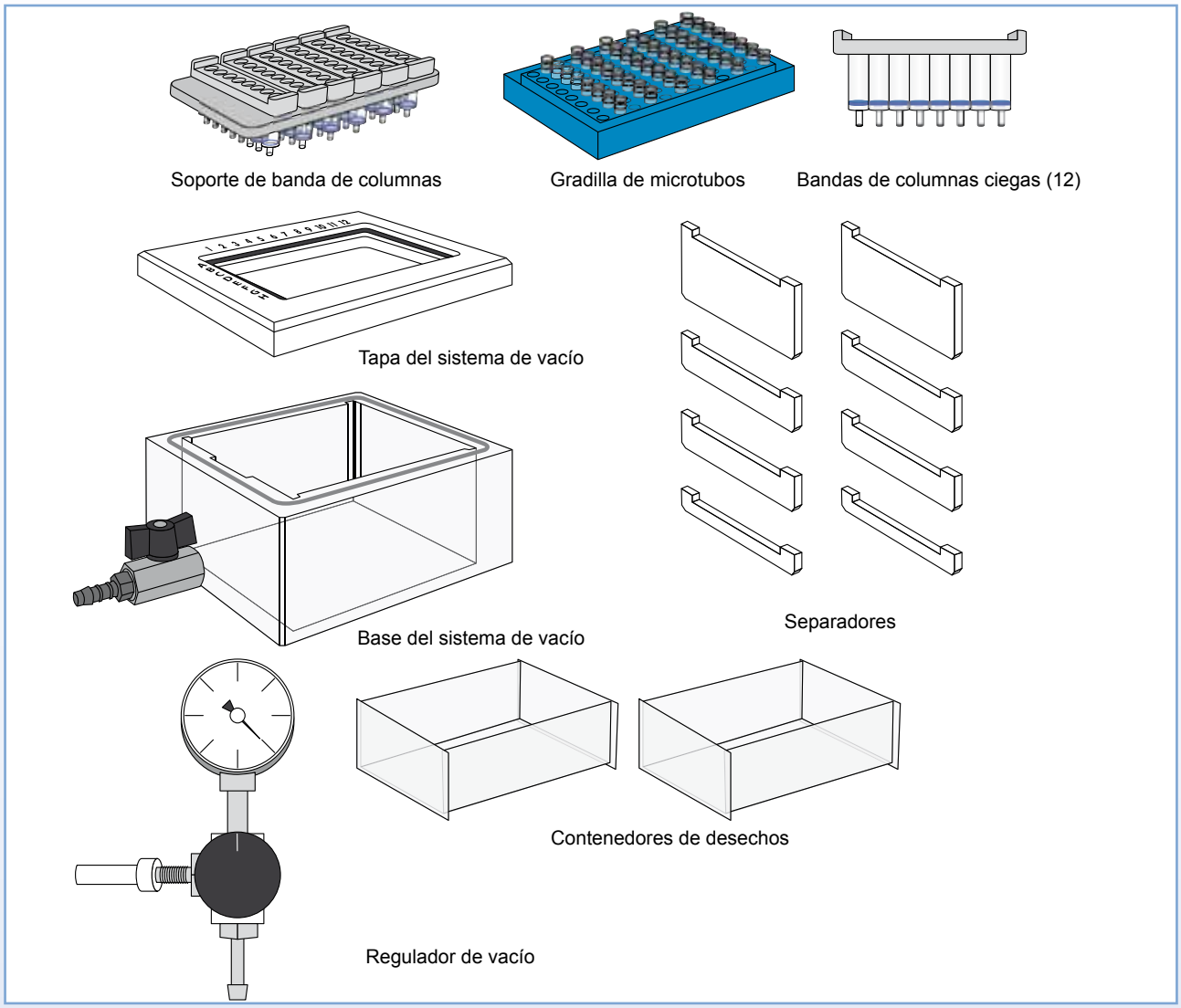


Figura 2: Contenido de oCheck® VacSet

9.1.2 oCheck® VacPump

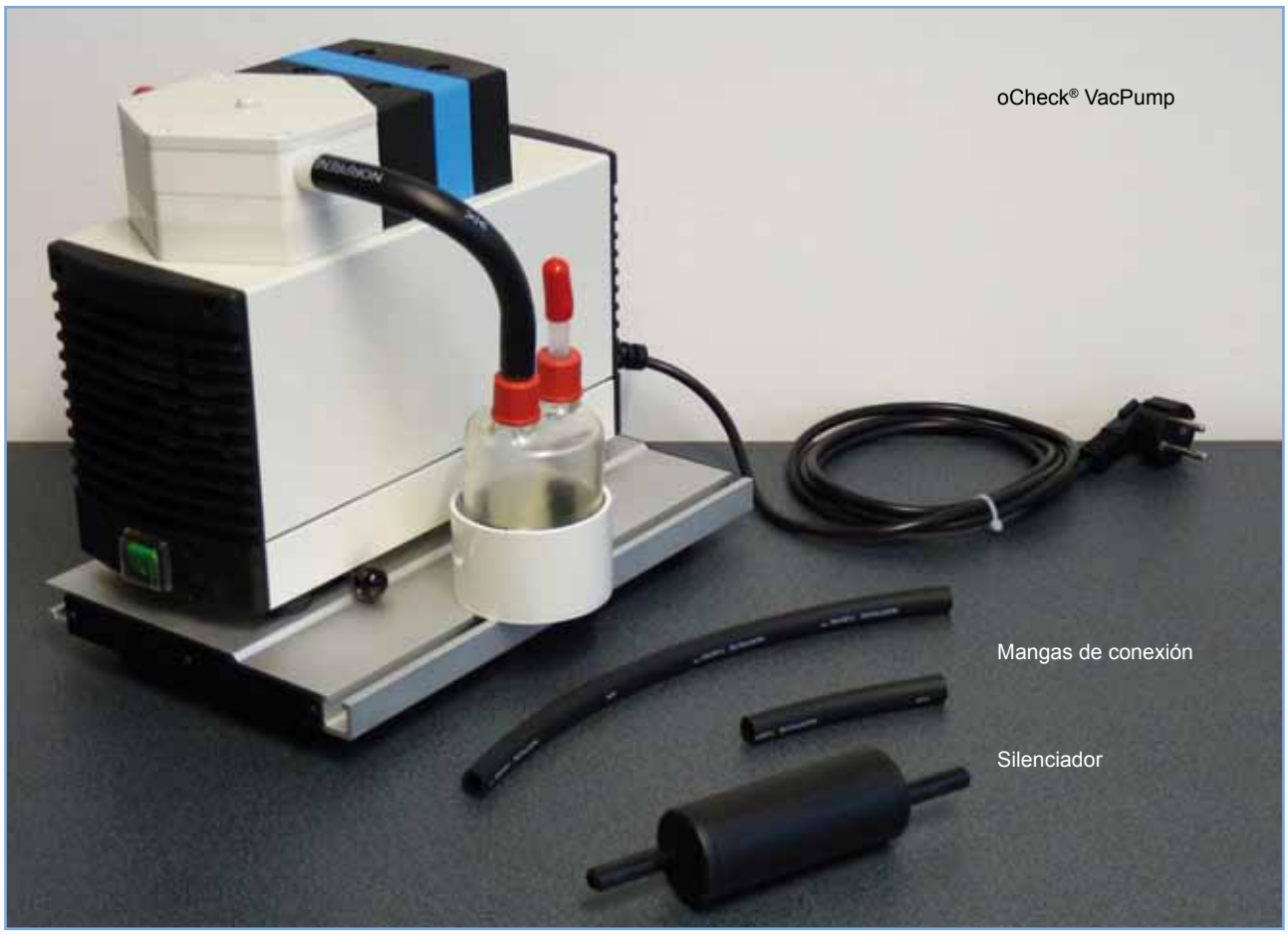
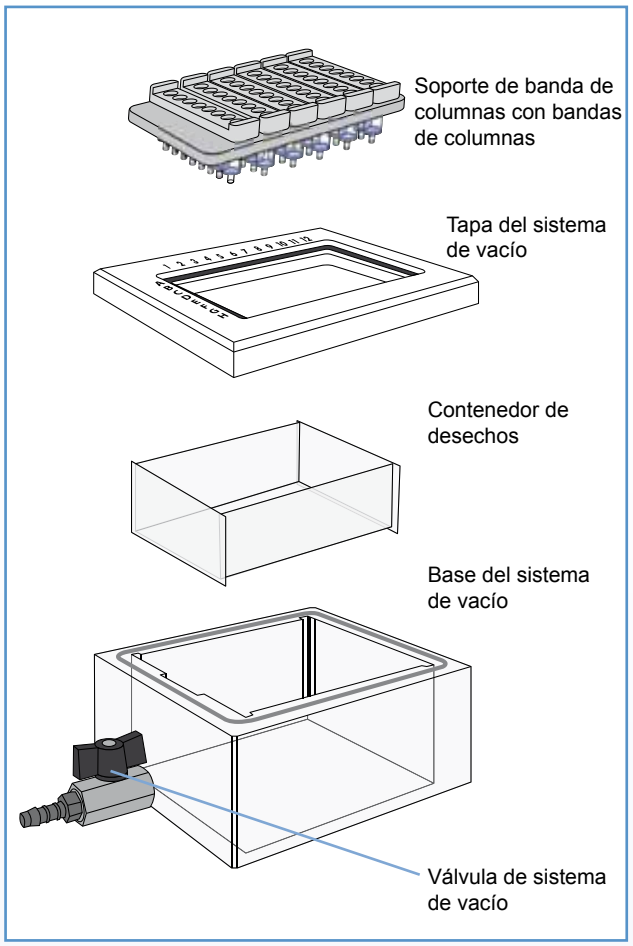


Figura 3: Contenido de oCheck® VacPump

9.2 Montaje de oCheck® VacSet

- Coloque la **base del sistema de vacío** sobre una superficie firme. El **sistema de vacío** debe prepararse tal como se muestra en la **figura 4 a+b**.


Soporte de banda de columnas con bandas de columnas
Tapa del sistema de vacío
Contenedor de desechos
Base del sistema de vacío
Válvula de sistema de vacío

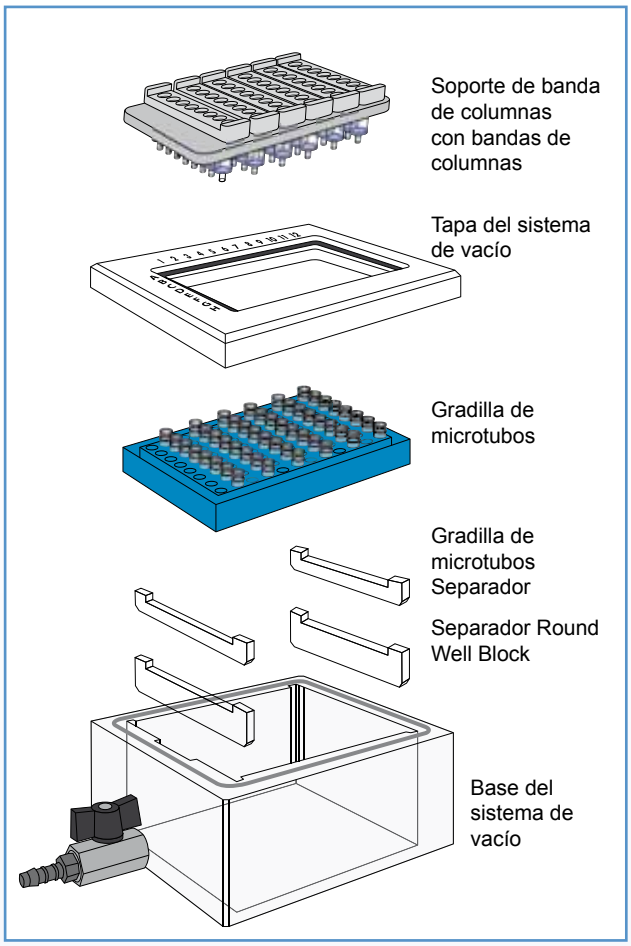

Soporte de banda de columnas con bandas de columnas
Tapa del sistema de vacío
Gradilla de microtubos
Gradilla de microtubos Separador
Separador Round Well Block
Base del sistema de vacío

Figura 4: a) Preparación para el lavado y la unión del ADN **b)** Preparación para la elución del ADN

9.2.1 Preparación para el lavado y la unión del ADN

- Para los procedimientos de lavado y unión del ADN (pasos del protocolo 10.3.5 - 10.3.7), prepare el **sistema de vacío** tal como se muestra en la figura 4a.
- Coloque uno de los dos **contenedores de desechos*** en el interior de la **base del sistema de vacío**.
- Cierre la **base del sistema de vacío** con la **tapa del sistema de vacío**.
- Coloque el **soporte de banda de columnas** en la junta de goma de la **tapa del sistema de vacío**.
- Inserte la cantidad necesaria de **bandas de columnas** en el **soporte de banda de columnas**.
- Asegúrese de que las **bandas de columnas** estén insertadas correctamente y de que las **bandas de columnas** queden fijadas firmemente al **soporte de banda de columnas** (se escuchará un 'clic'). Si se procesan menos de 48 muestras simultáneamente, solamente se debe insertar la cantidad necesaria de **bandas de columnas** en el soporte y el resto de las posiciones se deben rellenar en el **soporte de banda de columnas** con la cantidad adecuada de **bandas de columnas ciegas**.

!

Asegúrese de que las **bandas de columnas** y **las bandas de columnas ciegas** ajusten correctamente en el **soporte de banda de columnas** antes de aplicar el vacío.
* No lave el **contenedor de desechos** en el lavavajillas.

9.2.2 Preparación para la elución del ADN

Para los pasos de elución del ADN (paso 10.3.8 del protocolo), se debe modificar el **sistema de vacío** tal como se muestra en la **figura 4b**.

- Retire el **soporte de banda de columnas** junto con las **bandas de columnas** y colóquelos sobre una **hoja de papel** limpia (suministrada con el equipo).
- Retire la **tapa del sistema de vacío** y extraiga el **contenedor de desechos usado**.
- Inserte **separadores "Round Well Block"** y encima la **"gradilla de microtubos"** por los laterales estrechos de la **base del sistema de vacío** (**figura 4b**).
- Coloque la **gradilla de microtubos** sobre los **separadores**.
- Coloque la cantidad adecuada de tubos PCR etiquetados cada segunda fila de la **gradilla de microtubos** empezando por la fila n.º 2 de la **gradilla de microtubos**.
- Cierre el **sistema de vacío** y coloque las **bandas de columnas** encima. Compruebe que cada **banda de columnas** esté situada directamente sobre un tubo PCR para recolectar el ADN eluido (**figura 4c**). Vuelva a comprobar que todas las **bandas de columnas** y las **bandas de columnas ciegas** sigan estando correctamente encajadas en el **soporte de banda de columnas**.

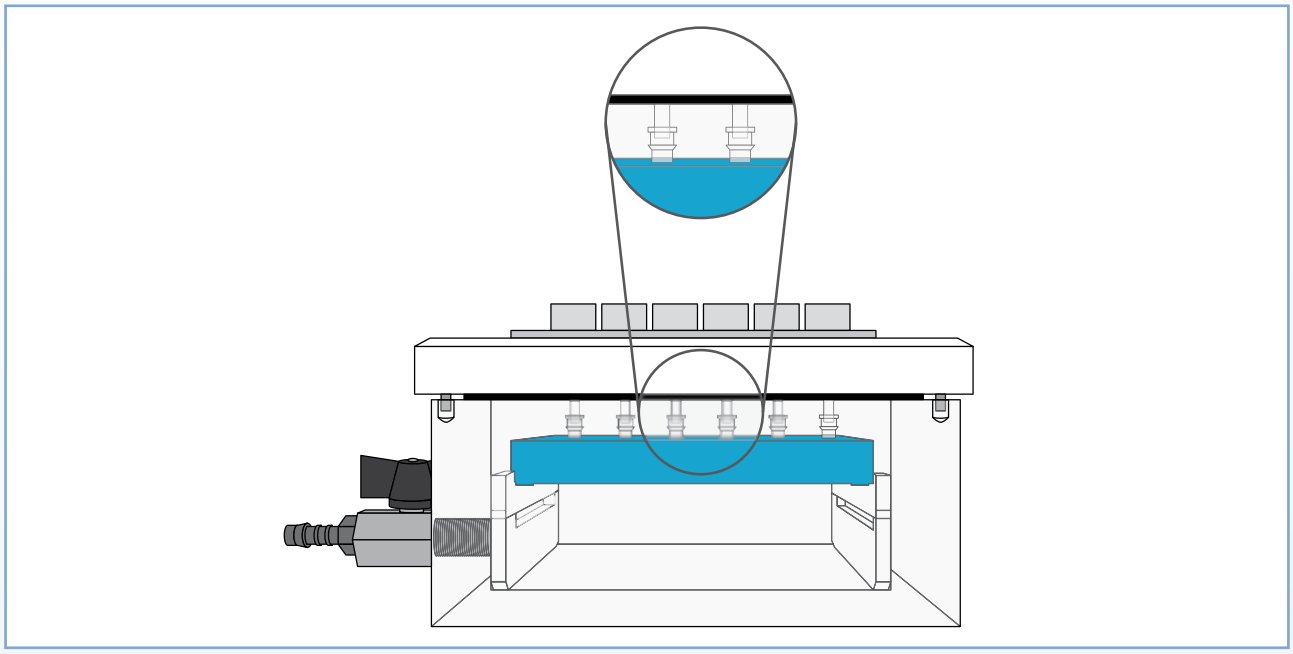


Figura 4c: Cada banda de columnas debe estar situada directamente sobre un tubo PCR de la banda PCR.

9.3 Montaje de oCheck® VacPump

Coloque oCheck® VacPump sobre una superficie firme. Se debe montar oCheck® VacPump tal y como se muestra en la figura 5a. Para conectar oCheck® VacPump al **sistema de vacío,** use la manga más larga de las dos **mangas de conexión** incluidas. Corte la **manga de conexión** más corta en dos partes (aproximadamente de 5 y 4 cm). Use la **manga de conexión de 5 cm** para conectar oCheck VacPump con el **regulador de vacío**. Fije el **silenciador** en el extremo opuesto de oCheck® VacPump en la salida mediante la **manga de conexión de 4 cm**.

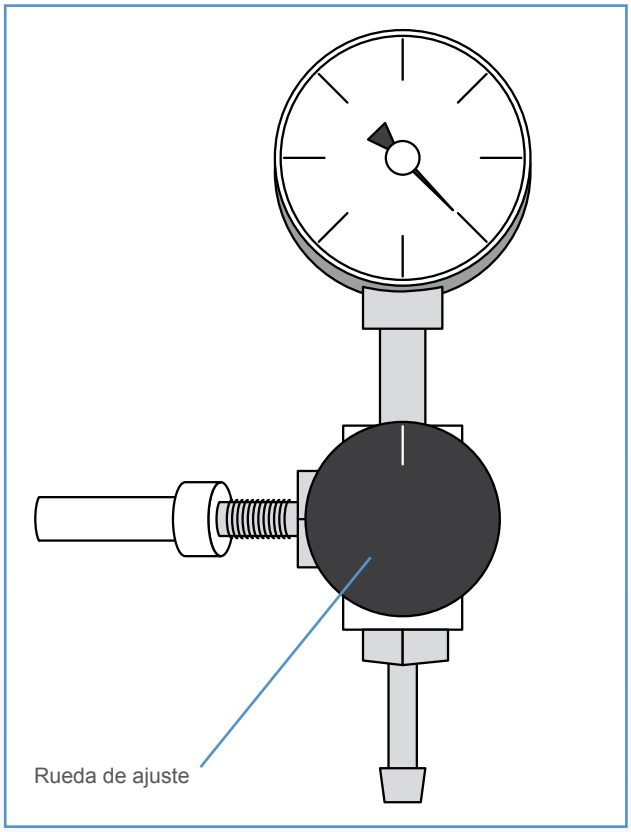


Figura 5: a) Montaje de oCheck® VacPump **b)** Regulador de vacío

9.4 Preparación del sistema de vacío

Asegúrese de que la **tapa del sistema de vacío**, el **soporte de banda de columnas** y las **bandas de columnas** estén colocadas correctamente. Cierre la **válvula del sistema de vacío** (**figura 5a**). Arranque la **bomba de vacío**. Ajuste el vacío según el protocolo del equipo mediante el **regulador de vacío** (**figura 5b**). Abra la **rueda de ajuste** hasta alcanzar el nivel de vacío necesario.

9.5 Aplicación del vacío

Cargue las muestras en las **bandas de columnas individuales**. Abra la **válvula del sistema de vacío** y, en caso necesario, presione las **bandas de columnas** brevemente hasta que empiece el flujo.

9.6 Ventilación del sistema de vacío

Cuando las muestras hayan pasado por el filtro de las **bandas de columnas,** cierre la **válvula del sistema de vacío** y detenga la **bomba de vacío**. Espere unos 30 segundos hasta que el **soporte de banda de columnas** con las **bandas de columnas** se pueda extraer con facilidad.

10. PREPARACIÓN CON BANDA DE 8 COLUMNAS (n.º de catálogo 515 050)

10.1 Preparación de soluciones de trabajo y condiciones de almacenamiento

Todos los componentes del equipo se deben conservar a **temperatura ambiente (18-25 °C)** y permanecerán estables durante **dos años** a partir de la fecha de su fabricación.

Antes de comenzar con el protocolo del Equipo de extracción de ADN oCheck®, prepare las siguientes soluciones:

1. **Solución de proteinasa K:** antes de utilizar el equipo por primera vez, añada **3,35 ml** de **tampón de proteinasa (PKB)** para disolver la proteinasa K **liofilizada**. Divida la solución en alícuotas y almacénela a -20 °C durante como máximo 6 meses. No vuelva a congelarla.

2. **Tampón W2:** Añada **200 ml** de **etanol** (p.a. ≥ 99,8 %) al **concentrado de tampón W2** . Marque la fecha actual en la etiqueta del frasco. **El tampón W2** permanece estable a **temperatura ambiente (18-25 °C)** durante como máximo **un año**.

3. **Tampón L4:** transfiera el **tampón L2** al **reactivo L3** en su totalidad y mezcle bien. Adhiera al frasco la etiqueta **L4** proporcionada en el equipo. Marque la fecha actual en la etiqueta del frasco. El **tampón L4** resultante permanece estable durante como máximo **un año** a **temperatura ambiente (18-25 °C)**.

4. **Solución de** ARN portador: añada **900 µl** de **tampón L1** para disolver el ARN portador **liofilizado**. Dispense el **ARN portador** disuelto en alícuotas, por ejemplo alícuotas de **50 µl**, para realizar 16 extracciones. Conserve la solución de ARN portador disuelto a **-20 °C**. No vuelva a congelarlo. Las ampollas usadas se deben desechar una vez descongeladas.

Durante el almacenamiento, especialmente a temperaturas bajas, es posible que se formen precipitados blancos en **los tampones L1, L2 o L4**. Dichos precipitados se pueden disolver con facilidad si se incuba el frasco a **50-70 °C** antes de utilizarlo.

10.2 Preparación de muestras

10.2.1 Preparación de muestras para Papill**oCheck**® y Papill**oCheck**® high-risk

Las muestras de citologías cervicouterinas humanas que se tomen con
- Papill**oCheck**® Collection Kit (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 465 070)
- Medio de toma de muestras **PreservCyt**® (Hologic, Bedford, MA, EE. UU.)

se pueden procesar directamente.

Las muestras de citologías cervicouterinas humanas que se tomen con
- Medio de toma de muestras **Surepath™** (BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) se deben lavar antes de usarlas: centrifugue **250 µl** de la muestra durante **5 minutos** a **11.000 g** y resuspenda el pellet en **250 µl** de agua destilada.

Las muestras de citologías cervicouterinas humanas que se tomen con
- Medio de toma de muestras **STM™** (Qiagen, Hilden, Alemania) deben diluirse en agua destilada: **100 µl** de muestra + **150 µl** de agua destilada.

!

En general, si la muestra de la citología cervicouterina está muy concentrada y ya agregada, es necesario diluir y homogeneizar la muestra antes de comenzar el proceso de extracción.

Las muestras de citologías cervicouterinas que estén muy diluidas y no presenten células visibles deben concentrarse a fin de obtener un mayor volumen de células para la extracción. Centrifugue hasta **1000 µl** de la muestra durante **5 minutos** a **11.000 g** y resuspenda el pellet en **250 µl** de agua destilada.

Este paso de concentración solo se puede aplicar a las muestras de citologías cervicouterinas tomadas con Papill**oCheck**® Collection Kit, el medio de toma de muestras **PreservCyt**® o el medio de toma de muestras **Surepath™**. Si se usó el medio de toma de muestras **STM™**, no es posible concentrar mediante centrifugado.

➠ Pipetee 250 µl de la solución de la muestra en un microtubo de 1,5 ó 2 ml. Para evitar la contaminación, use microtubos con tapa de seguridad o tapa roscada para los pasos de lisis.

Se recomienda validar el procedimiento completo de aislamiento del ADN en cada ciclo de extracción de ADN mediante un control de muestra negativo.

10.3 Protocolo estándar

Para usar el Equipo de extracción de ADN oCheck® - Preparación con banda de 8 columnas con vacío se necesita un sistema de vacío adecuado. El equipo necesario así como las instrucciones de instalación y trabajo se describen en el capítulo 9.

10.3.1 Preparación

- Compruebe que la centrífuga esté ajustada a **temperatura ambiente (18-25 °C)**.
- Prepare las muestras según las instrucciones del capítulo 10.2.
- Caliente los bloques de calentamiento o los baños María a **56 ºC** y a **70 ºC**, respectivamente.
- Antes de la elución, incube el **tampón E de elución** a **70 ºC**.
- Asegúrese de que las soluciones de trabajo se hayan preparado según las instrucciones del capítulo 10.1.

10.3.2 Prelisis

- Añada **80 µl** de **tampón L1**.
- Añada **2,4 µl** de la solución de **ARN portador** preparada.
- Añada **20 µl** de la solución de **proteinasa K** .
- Cierre la tapa y mezcle brevemente con un Vortex de impulso.

! Si está procesando varias muestras, **la proteinasa K, el tampón L1** y **el ARN portador** se deberían premezclar inmediatamente antes del uso. No mezcle nunca el **tampón L1** y la **proteinasa K** más de 10-15 minutos antes de añadirlos a la muestra. **La proteinasa K** tiene tendencia a la autolisis en **tampón L1** en ausencia de un sustrato.

- Incube a **56 ºC** durante al menos **30 minutos**. Agite las muestras en una Thermomixer a **650 rpm**. Si usa un bloque de calentamiento o un baño María, mezcle las muestras con Vortex de vez en cuando durante el periodo de incubación.

10.3.3 Lisis

- Centrifugue brevemente el microtubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.
- Añada **250 µl** de **tampón L4**.
- Cierre la tapa y mezcle brevemente con un Vortex de impulso durante **10 segundos**.
- Incube a **70 ºC** durante **15 minutos**.
- Cierre bien la tapa de los microtubos para impedir una apertura accidental.

10.3.4 Ajuste de las condiciones de unión del ADN

- Centrifugue brevemente el microtubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.
- Añada **300 µl** de **etanol** (p.a. ≥ 99,8 %) a la muestra.
- Cierre la tapa inmediatamente y mezcle brevemente con un Vortex de impulso durante **15 segundos**.
- Centrifugue brevemente el microtubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.

10.3.5 Unión del ADN

- Prepare el **sistema de vacío** oCheck® **de** acuerdo con la **figura 6** (para una descripción más detallada consulte el capítulo 9).

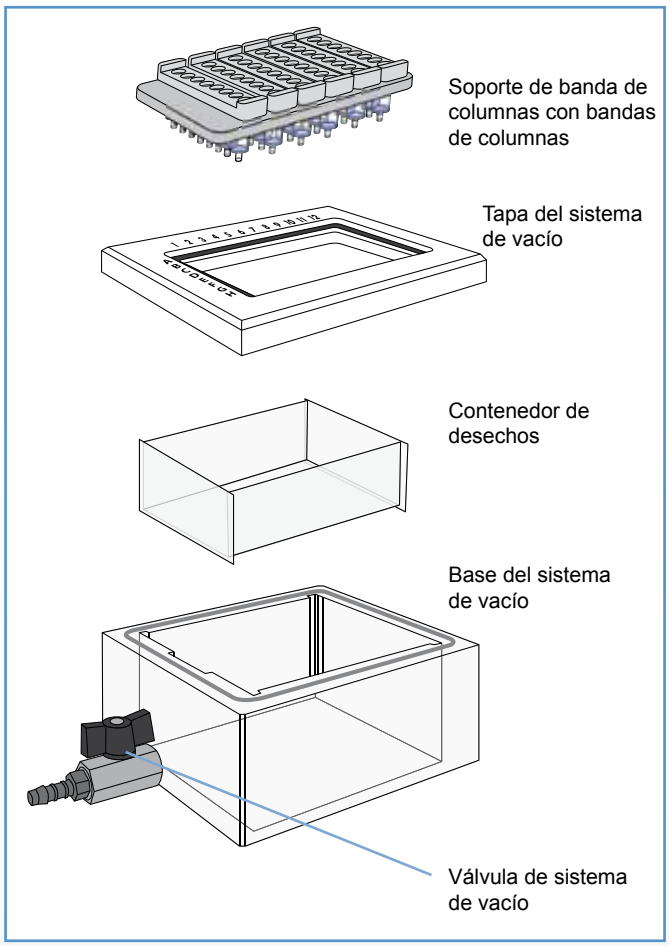

Soporte de banda de columnas con bandas de columnas
Tapa del sistema de vacío
Contenedor de desechos
Base del sistema de vacío
Válvula de sistema de vacío

Figura 6: Preparación para el lavado y la unión del ADN

- Coloque uno de los dos **contenedores de desechos*** en el interior de la **base del sistema de vacío**.
- Cierre la **base del sistema de vacío** con la **tapa del sistema de vacío**.
- Coloque el **soporte de banda de columnas** en la junta de goma de la **tapa del sistema de vacío**.
- Inserte la cantidad necesaria de **bandas de columnas** en el **soporte de banda de columnas**. Asegúrese de que las **bandas de columnas** estén insertadas correctamente y de que las **bandas de columnas** estén bien fijadas al **soporte de banda de columnas** (se escuchará un 'clic'). Si se procesan menos de 48 muestras simultáneamente, solamente se debe insertar la cantidad necesaria de **bandas de columnas** en el soporte y el resto de las posiciones se deben rellenar en el **soporte de banda de columnas** con la cantidad adecuada de **bandas de columnas ciegas**.

!

Asegúrese de que las **bandas de columnas** y las **bandas de columnas ciegas** ajusten correctamente en el **soporte de banda de columnas** antes de aplicar el vacío.

* No lave el **contenedor de desechos usado** en el lavavajillas.

- Pipetee **900 µl** de los lisados en los pocillos de las **bandas de columnas** con cuidado de no humedecer los bordes de los pocillos (**figura 7**).

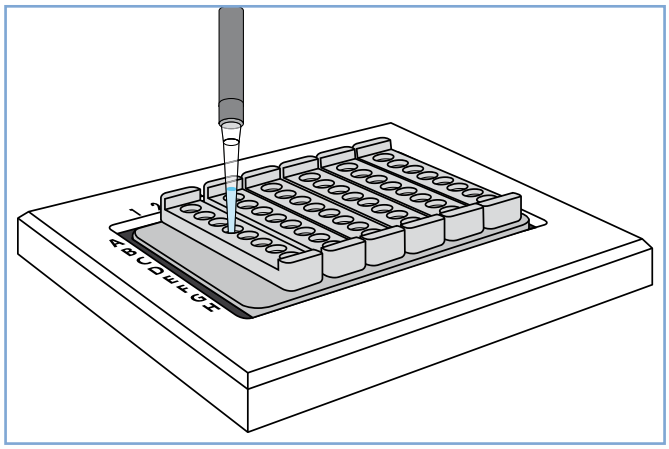


Figura 7: Pipetee el lisado en los pocillos de las bandas de columnas

- Ajuste el vacío a **-200 mbar** con el regulador de vacío (**figura 8a**).
- Aplique lentamente el vacío abriendo la **válvula del sistema de vacío** hasta que todos los lisados pasen por las columnas (**figura 8b**).

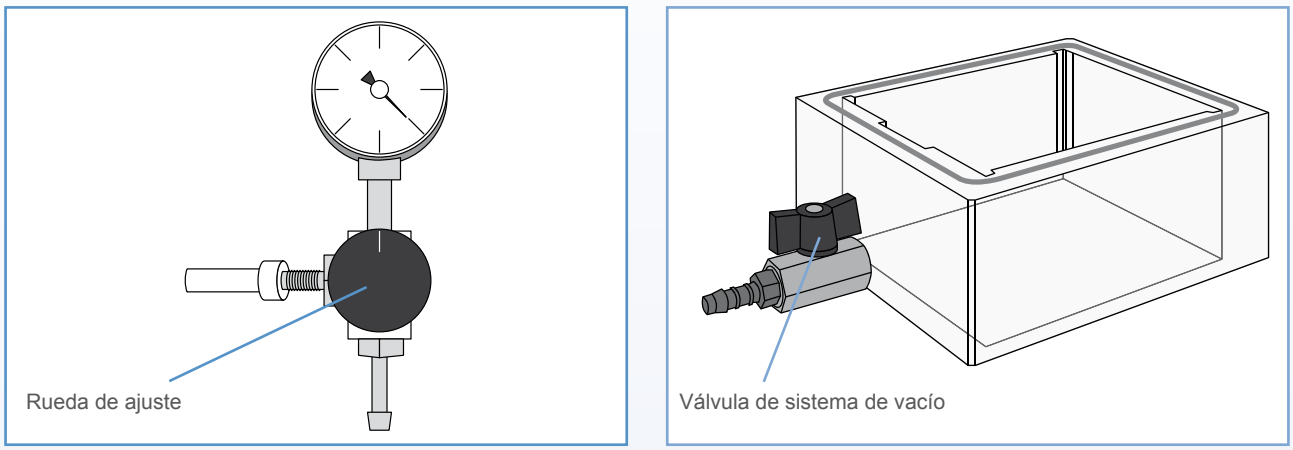


Figura 8: a) Regulador de vacío **b)** Válvula del sistema de vacío

- Detenga el vacío inmediatamente después de que todo el líquido haya pasado por las columnas (aproximadamente **30 segundos**) cerrando la **válvula del sistema de vacío** para evitar la formación de espuma.
- Apague la **bomba de vacío** y libere el vacío.

10.3.6 Lavado de bandas de columnas

Para los siguientes pasos se recomienda el uso de la pipeta de 8 canales y los depósitos de tampón (para los volúmenes de tampón necesarios cuando se usan depósitos de tampón, consulte **la tabla 1**). Si usa depósitos de tampón, prepare la cantidad adecuada de soluciones tampón.

Número de muestras que se extraerán	8	16	24	32	40	48
Tampón W1	6,5 ml	12 ml	17,5 ml	23 ml	28,5 ml	34 ml
Tampón W2*	16 ml	32 ml	48 ml	64 ml	80 ml	96 ml

Tabla 1: Cantidad necesaria de soluciones tampón para n = x muestras

* Antes de usar por primera vez, añada 200 ml de etanol (consulte también el capítulo 10.1).

- Añada **600 µl** de **tampón W1** a cada pocillo de las **bandas de columnas** (**figura 9 a+b**).

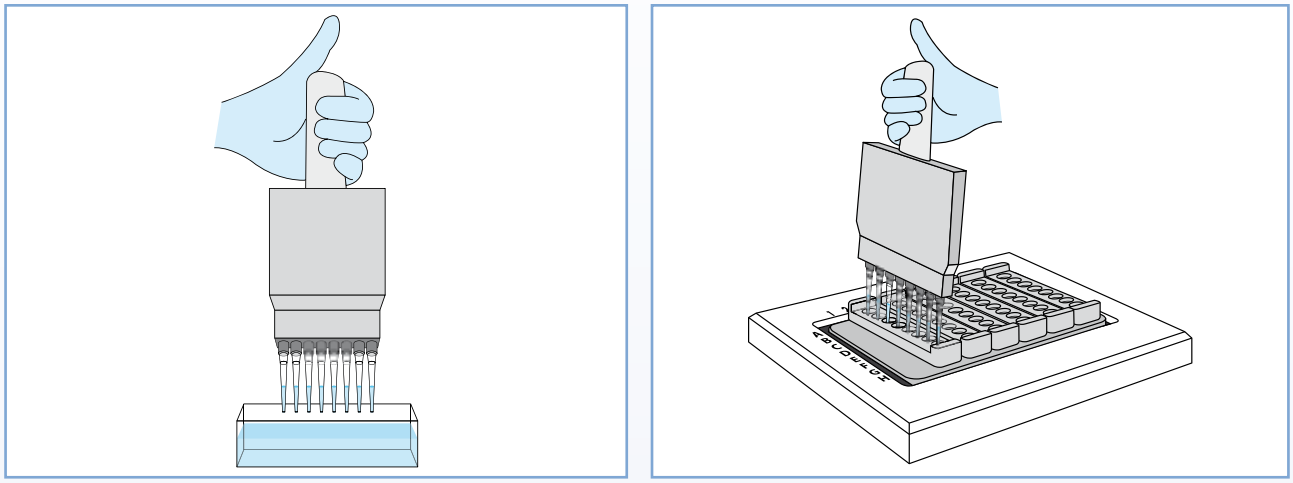


Figura 9: a) Pipetee tampón W1 desde el depósito de tampón. **b)** Adición de tampón W1 a los pocillos de las bandas de columnas.

- Ajuste el vacío a **-200 mbar** con el **regulador de vacío**.
- Aplique lentamente el vacío abriendo la **válvula del sistema de vacío** hasta que todos los lisados pasen por las columnas (**figura 8**).
- Detenga el vacío inmediatamente cerrando la **válvula del sistema de vacío** después de que todo el líquido haya pasado por las columnas (aproximadamente **30 segundos**) para evitar la formación de espuma.
- Añada **900 µl** de **tampón W2** a cada pocillo de las **bandas de columnas**.
- Ajuste el vacío a **-200 mbar** con el **regulador de vacío**.
- Aplique el vacío hasta que el tampón haya pasado por las columnas (aproximadamente **30 segundos**).
- Detenga el vacío inmediatamente cerrando la **válvula del sistema de vacío** después de que todo el líquido haya pasado por las columnas (aproximadamente **30 segundos**) para evitar la formación de espuma.
- Añada **900 µl** de **tampón W2** a cada pocillo de las **bandas de columnas**.
- Ajuste el vacío a **-200 mbar** con el **regulador de vacío**.
- Aplique el vacío hasta que todo el tampón haya pasado por las columnas (aproximadamente **30 segundos**).
- Detenga el vacío inmediatamente cerrando la **válvula del sistema de vacío** después de que todo el líquido haya pasado por las columnas (aproximadamente **30 segundos**) para evitar la formación de espuma.
- Apague la **bomba de vacío** y libere el vacío.

10.3.7 Secado de bandas de columnas

- Tras el paso de lavado final, detenga el vacío y ventile el **sistema de vacío** (sección 9.6). Retire el **soporte de banda de columnas** junto con las **bandas de columnas**. Retire la **tapa del sistema de vacío** y extraiga el **contenedor de desechos usado** y sustitúyalo por el no usado (limpio).
- Inserte la **tapa del sistema de vacío** junto con el **soporte de banda de columnas** y las **bandas de columnas** en la **base del sistema de vacío**. Asegúrese de que el **sistema de vacío** esté bien cerrado y de que todas las **bandas de columnas** o las **bandas de columnas ciegas** ajusten correctamente.
- Aplique el máximo vacío (al menos **~400 - ~600 mbar** de diferencia de presión) durante **10 minutos** para secar la membrana totalmente.
- Apague la **bomba de vacío** y libere el vacío.

> **!** Este paso es necesario para eliminar los rastros de etanol. El etanol presente en el **tampón W2** inhibe las reacciones enzimáticas y debe ser totalmente eliminado antes de la elución del ADN.

10.3.8 Elución del ADN

Para los siguientes pasos de elución, se debe modificar el **sistema de vacío** según lo indicado en la **figura 10**.

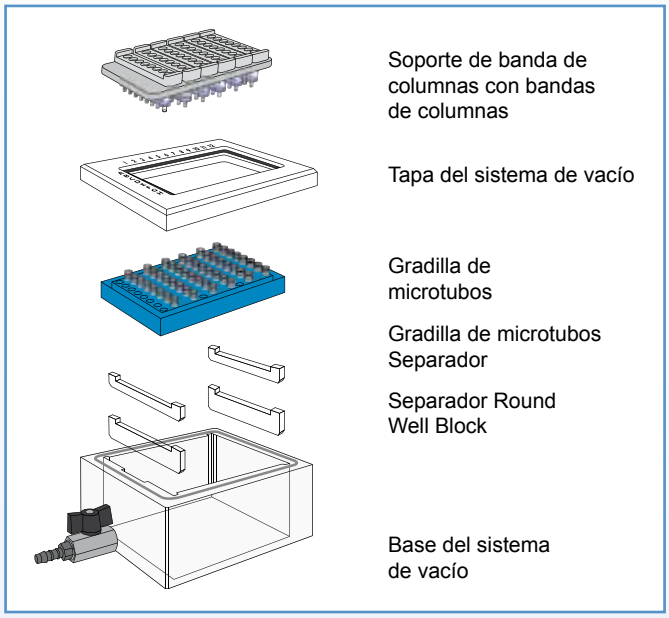

Soporte de banda de columnas con bandas de columnas
Tapa del sistema de vacío
Gradilla de microtubos
Gradilla de microtubos Separador
Separador Round Well Block
Base del sistema de vacío

Figura 10: Preparación para la elución del ADN

- Retire el **soporte de banda de columnas** junto con las **bandas de columnas** y colóquelos sobre una **hoja de papel** limpia (suministrada con el equipo).
- Retire la **tapa del sistema de vacío** y extraiga el **contenedor de desechos usado**.
- Inserte **separadores "Round Well Block"** y encima la **"gradilla de microtubos"** en los **laterales estrechos de la** base del sistema de vacío (**figura 10**).
- Coloque la **gradilla de microtubos** sobre los **separadores**.
- Coloque la cantidad adecuada de tubos PCR etiquetados cada segunda fila de la **gradilla de microtubos** empezando por la fila n.º 2 de la **gradilla de microtubos**.
- Cierre el **sistema de vacío** y coloque las **bandas de columnas** encima. Compruebe que cada **banda de columnas** esté situada directamente sobre un tubo PCR para recolectar el ADN eluido (**figura 11**). Vuelva a comprobar que todas las **bandas de columnas** y las **bandas de columnas ciegas** sigan estando fijadas correctamente en el **soporte de banda de columnas**.

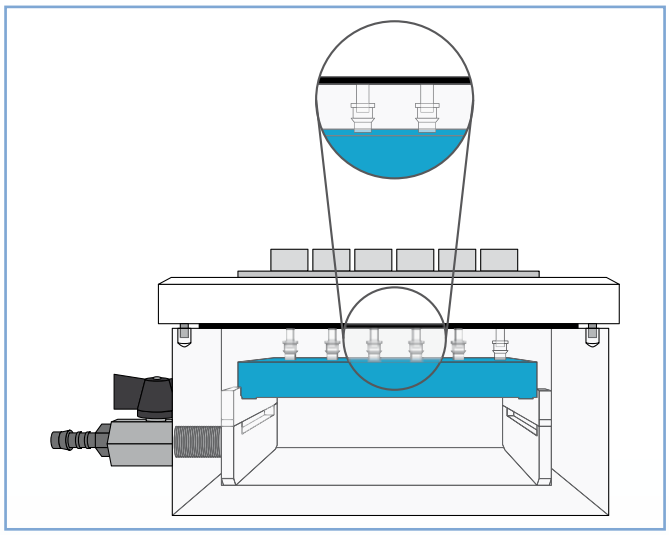


Figura 11: Cada banda de columnas debe estar situada directamente sobre un tubo PCR de la banda PCR.

- Pipetee **100 µl** de tampón E precalentado (**70 ºC**) directamente en la membrana de cada **banda de columnas** utilizando una micropipeta monocanal. **Se deben utilizar puntas nuevas para cada muestra.**
- Incube durante **5 minutos** a **temperatura ambiente**.
- Aplique lentamente el vacío hasta un máximo de **-400 mbar** abriendo la **válvula del sistema de vacío**.
- Detenga rápidamente el vacío cerrando la **válvula del sistema de vacío** inmediatamente después de que todo el líquido haya pasado por las columnas para evitar la formación de espuma.
- Apague la **bomba de vacío** y libere el vacío.
- Cierre los tubos PCR etiquetados para almacenarlos.

!

Para obtener resultados óptimos con el ADN aislado en las aplicaciones posteriores se recomienda realizar la elución con el **tampón E suministrado**. Conserve el ADN extraído a **-20 ºC**.
Para realizar más análisis con los ensayos de la gama de productos oCheck®, consulte los manuales de instrucciones correspondientes (Papill**oCheck®** y Papill**oCheck®** high-risk).

11. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema y causa	Comentarios y sugerencias
LA CANTIDAD DE ADN OBTENIDA ES NULA O INSUFICIENTE	
Lisis incompleta	• La muestra no se ha mezclado y homogeneizado totalmente con el tampón L1 y la proteinasa K. La mezcla se debe mezclar enérgicamente en un Vortex inmediatamente después de añadirse el tampón L1. • Número de células insuficiente en la muestra. • Disminución de la actividad de la proteinasa K: divida la solución en alícuotas y consérvela a -20 ºC durante como máximo 6 meses. No vuelva a congelarla.
Reactivos no aplicados correctamente	• Prepare los tampones L4 y W2 y las soluciones de ARN portador y proteinasa K según se indica en la sección 8.1 o la 10.1. Añada etanol a los lisados antes de cargarlos en las columnas.
Elución deficiente del ADN desde la columna	• Precaliente el tampón E a 70 °C antes de realizar la elución. Aplique el tampón E directamente en el centro de la membrana de sílice. • La eficiencia de la elución desciende notablemente si la elución se realiza con tampones a un pH < 7,0. Use tampones de elución ligeramente alcalinos, como el tampón E (pH 8,5).
COLUMNAS OBTURADAS	
Lisis incompleta	• La muestra no se ha mezclado y homogeneizado totalmente con el tampón L1 y la proteinasa K. La mezcla se debe mezclar enérgicamente en un Vortex inmediatamente después de añadirse el tampón L1. • Disminución de la actividad de la proteinasa K: divida la solución en alícuotas y consérvela a -20 ºC durante como máximo 6 meses. No vuelva a congelarla.
Reactivos no aplicados correctamente	• Prepare los tampones L4 y W2 y las soluciones de ARN portador y proteinasa K según se indica en la sección 8.1 o la 10.1. Añada etanol a los lisados antes de cargarlos en las columnas.
RENDIMIENTO DEFICIENTE DEL ADN EN REACCIONES ENZIMÁTICAS	
Contaminación cruzada de etanol o sal	• Asegúrese de centrifugar al menos durante 1 minuto a 11.000 g a fin de eliminar todo el tampón W2 etanólico antes de eluir el ADN. Si, por cualquier motivo, el nivel del tampón W2 ha alcanzado la salida de la columna antes de secarse, repita el centrifugado. • No refrigere el tampón W2 antes de usarlo. Si está frío, no eliminará la sal de forma eficiente. Lleve el tampón W2 a temperatura ambiente antes de usarlo.
Contaminación del ADN con sustancias inhibidoras	• No eluya el ADN con el tampón TE. El EDTA puede inhibir las reacciones enzimáticas. Vuelva a purificar el ADN y elúyalo con el tampón E. • Si la proporción A260/280 del eluado es inferior a 1,6, repita el procedimiento de purificación: añada al eluado 1 volumen de tampón L4 más 1 volumen de etanol (96-100%). Cargue la mezcla en una columna de centrifugado y proceda a realizar el paso de unión del ADN (sección 8.3.5 o 10.3.5) del protocolo estándar.

12. ASISTENCIA TÉCNICA

Greiner Bio-One cuenta con un departamento de servicio técnico compuesto por científicos con amplia experiencia tanto práctica como teórica en biología molecular y en los productos oCheck®. Si tiene cualquier duda o problema con los productos oCheck®, no dude en ponerse en contacto con su distribuidor local de Greiner Bio-One.

13. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El Equipo de extracción de ADN oCheck® es un accesorio de diagnóstico in vitro para los ensayos de la gama de productos oCheck® . Se ha comprobado el rendimiento analítico y específico del Equipo de extracción de ADN oCheck® junto con el ensayo relevante. Consulte los manuales de instrucciones de los productos oCheck® correspondientes para una descripción detallada del rendimiento [Papill**oCheck**® (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 465 060), Papill**oCheck**® high-risk (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 505 060) y Pelv**oCheck**® CT/NG (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 504 002)].

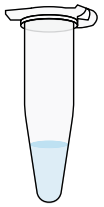
14. PROTOCOLOS BREVES

14.1 Protocolo breve para la preparación con una columna (n.º de catálogo 515 040)

Extracción del ADN mediante el Equipo de extracción de ADN oCheck® con preparación con una columna (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 515 040)

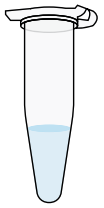
1. PREPARACIÓN

- Comprobar que la centrífuga esté a temperatura ambiente (18-25 °C)
- Preparar las soluciones de trabajo según el capítulo 8.1
- Calentar los bloques de calentamiento o los baños María a 56 y 70 °C
- Precalentar el tampón E de elución a 70 °C
- Preparar las muestras según las instrucciones del capítulo 8.2
- Pipetear 250 µl de muestra en un microtubo de 1,5 ó 2 ml



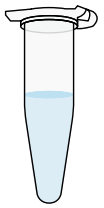
2. PRELISIS

- 80 µl de tampón L1
- 2,4 µl de solución de ARN portador
- 20 µl de solución de proteinasa K
- Agitar brevemente en el Vortex
- 56 °C durante al menos 30 minutos
- Centrifugar brevemente



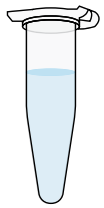
3. LISIS

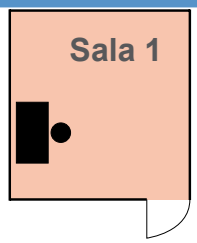
- 250 µl de tampón L4
- Agitar brevemente en el Vortex
- 70 °C durante 15 minutos
- Centrifugar brevemente



4. AJUSTE DE LAS CONDICIONES DE UNIÓN DEL ADN

- 300 µl de etanol
- Agitar brevemente en el Vortex
- Centrifugar brevemente





5. UNIÓN DEL ADN

- Preparar columnas
- 450 µl de lisado
- 1 minuto a 11.000 g
- 450 µl de lisado
- 1 minuto a 11.000 g

6. LAVADO DE LAS COLUMNAS

- 500 µl de tampón W1
- 1 minuto a 11.000 g
- 600 µl de tampón W2
- 1 minuto a 11.000 g

7. SECADO DE LAS COLUMNAS

- Centrifugar 1 minuto a 11.000 g

8. ELUCIÓN DEL ADN

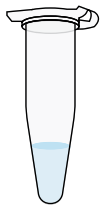
- 100 µl de tampón E (precalentado a 70 °C)
- 1 minuto a temperatura ambiente (18-25 °C)
- 1 minuto a 11.000 g

14.2 Protocolo breve para la preparación con banda de 8 columnas (n.º de catálogo 515 050)

Extracción del ADN mediante el Equipo de extracción de ADN oCheck® - Preparación con banda de 8 columnas (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 515 050)

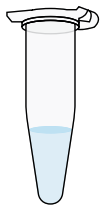
1. PREPARACIÓN

- Comprobar que la centrífuga esté a temperatura ambiente (18-25 °C)
- Preparar las soluciones de trabajo según el capítulo 10.1
- Calentar los bloques de calentamiento o los baños María a 56 y 70 °C
- Precalentar el tampón E de elución a 70 °C
- Preparar las muestras según las instrucciones del capítulo 10.2
- Pipetear 250 µl de muestra en un microtubo de 1,5 ó 2 ml



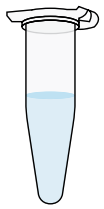
2. PRELISIS

- 80 µl de tampón L1
- 2,4 µl de solución de ARN portador
- 20 µl de solución de proteinasa K
- Agitar brevemente en el Vortex
- 56 °C durante al menos 30 minutos
- Centrifugar brevemente



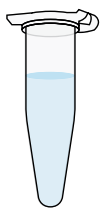
3. LISIS

- 250 µl de tampón L4
- Agitar brevemente en el Vortex
- 70 °C durante 15 minutos
- Centrifugar brevemente



4. AJUSTE DE LAS CONDICIONES DE UNIÓN DEL ADN

- 300 µl de etanol
- Agitar brevemente en el Vortex
- Centrifugar brevemente

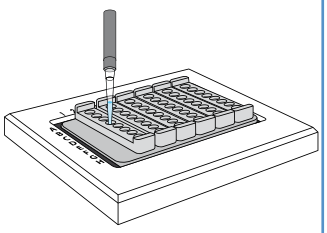


PROTOCOLO BREVE

PROTOCOLO BREVE

5. UNIÓN DEL ADN

- Pipetear 900 µl de lisado en las bandas de columnas
- Aplicar vacío: -200 mbar*
- Evitar la formación de espuma.

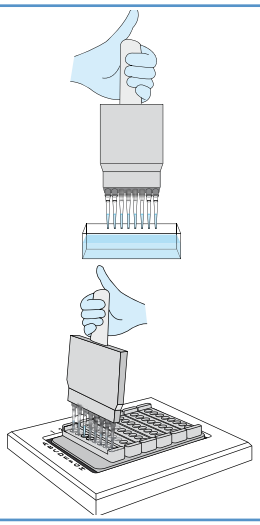


6. LAVADO DE BANDAS DE COLUMNAS

- 1er lavado: 600 µl de tampón W1
- 2° lavado: 900 µl de tampón W2
- 3er lavado: 900 µl de tampón W2

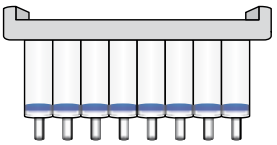
Para cada paso de lavado:

- 30-60 segundos
- -200 mbar*
- Evitar la formación de espuma.



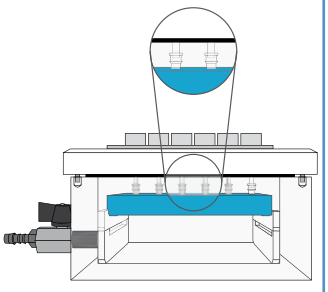
7. SECADO DE BANDAS DE COLUMNAS

- 10 minutos a -600 mbar*



8. ELUCIÓN DEL ADN

- 100 µl de tampón E (precalentado a 70 °C)
- 5 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C)
- Aplicar vacío: -400 mbar*
- Evitar la formación de espuma.



* Reducción de la presión atmosférica: según la viscosidad de la muestra puede ser necesario aumentar el tiempo de filtrado o el vacío (por ejemplo de -200 a -400 mbar).